### PCT

#### WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

A61K 31/425

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/40832

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

6. November 1997 (06.11.97)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE97/00820

A1

(22) Internationales Anmeldedatum:

24. April 1997 (24.04.97)

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, JP, KR, MX, NZ, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(30) Prioritätsdaten:

196 16 486.9

25. April 1996 (25.04.96)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HANS-KNÖLL-INSTITUT FÜR NATURSTOFF-FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Beutenbergstrasse 11, D-07745 Jena (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DEMUTH, Hans-Ulrich [DE/DE]; Hegelstrasse 14, D-06114 Halle (DE). ROSCHE, Fred [DE/DE]; Benndorfer Strasse 18a, D-06184 Dieskau (DE). SCHMIDT, Jörn [DE/DE]; Eichendorffstrasse 2, D-06114 Halle (DE). PAULY, Robert, P. [CA/CA]; 2631 Fairview Crescent, Vancouver, British Columbia V6T 2B8 (CA). MCINTOSH, Christopher, H., S. [CA/CA]; 605-2233 Allison Road, Vancouver, British Columbia V6T 1T7 (CA). PEDERSON, Ray, A. [CA/CA]; 3876 West 23rd Avenue, Vancouver, British Columbia V6S 1K9 (CA).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: USE OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV INHIBITORS FOR LOWERING THE BLOOD GLUCOSE LEVEL IN MAMMALS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV HEMMER ZUR SENKUNG DES BLUTGLUKOSESPIEGELS IN SÄUGERN

#### (57) Abstract

The invention relates to the use of a method in which by reducing in the blood of a mammal by administration of effectors the enzyme activity of dipeptidyl peptidase (DP IV) or enzyme activity similar to DP IV, the endogenous (or additionally exogenously administered) insulinotropic peptide gastric inhibitory polypeptide 1-42 (GIP<sub>1-42</sub>) and glucagon-like peptide amide-1 7-36 (GLP-1<sub>7-36</sub>) (or similarly GLP-1<sub>7-37</sub> or analogues thereof) are decomposed in a causal sequence to a reduced extent by DP IV enzymes or those similar to DP IV. Consequently, the fall in the concentration of said peptide hormones or the analogues thereof is reduced or retarded. The increased stability, achieved by the action of DP IV effectors, of the incretine or the analogues thereof which are available endogenously or exogenously and consequently provided in increased numbers for insulinotropic stimulation of the incretine receptors of the Langerhans cells in the pancreas, changes the power of endogenous insulin thereby stimulating the metabolism of carbohydrates in the treated organism. The blood sugar level therefore drops below the glucose concentration, characteristic of hyperglycaemia, in the serum of the treated organism. Metabolic anomalies such as glucosuria, hyperlipidemia, possible serious metabolic acidosis, diabetes mellitus, which result from higher concentrations of glucose in the blood over a longer period of time, are prevented or alleviated. The method according to the invention is a novel way of lowering high blood glucose concentrations. It is simple, commercially applicable and suitable for use in human medicine for treating, in particular diseases caused by above-average blood glucose levels.

#### (57) Zusammenfassung

Die Erfindung beinhaltet die Anwendung eines Verfahrens, bei dem durch die Reduktion von Dipeptidyl Peptidase (DP IV-) bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität im Blut eines Säugers durch Verabreichung von Effektoren, in kausaler Folge die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP1-42) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP-17-36) (o.a. GLP-17-37 oder deren Analoga) durch DP IV- und DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert wird. In Folge dieser, durch die Wirkung von DP IV-Effektoren erzielten, erhöhten Stabilität der (endogen vorhandenen oder exogen zugeführten) Incretine oder ihrer Analoga, die damit vermehrt für die insulinotrope Stimulierung der Incretin-Rezeptoren der Langerhansschen Zellen im Pankreas zur Verfügung stehen, verändert sich die Wirksamkeit von körpereigenem Insulin, was eine Stimulierung des Kohlehydratstoffwechsels des behandelten Organismus nach sich zieht. Als Resultat sinkt der Blutzuckerspiegel unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum des behandelten Organismus. Damit können Stoffwechselanomalien wie Glukosurie, Hyperlipidamie sowie mögliche schwere metabolische Azidosen, Diabetes mellitus, die die Folge längerer, erhöhter Glukosekonzentrationen im Blut sind, verhindert bzw. gemildert werden. Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine neuartige Herangehensweise zur Senkung erhöhter Blutglukosekonzentration dar. Es ist einfach, kommerziell nutzbar und zur Anwendung bei der Therapie, insbesondere von Erkrankungen, die auf überdurchschnittlichen Blutglukosewerten basieren, in der Humanmedizin geeignet.

#### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Amenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Osterreich	FR	Prankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tichad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Burbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadachikistan
BĒ	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Turkei
BG	Bulgarien	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	1E	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	is	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	JT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CP CP	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan .	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KB	Kenia	NL	Niederlande	VN	Victnam
СН	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumanien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

15

20

25

30

VERWENDUNG VON DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV HEMMER ZUR SENKUNG DES BLUTGLUKOSE-SPIEGELS IN SÄUGERN

Die Erfindung betrifft ein einfaches Verfahren zur Senkung der Blutzuckerkonzentration mit Hilfe von aktivitätsmindernden *Effektoren* (Substraten, Pseudosubstraten, Inhibitoren, Bindungsproteinen, Antikörpern u. a.) für Enzyme mit vergleichbarer oder identischer Aktivität zur enzymatischen Aktivität des Enzyms Dipeptidyl Peptidase IV.

Neben Proteasen, die in unspezifische Proteolyse einbezogen sind, was letztlich den Abbau von Proteinen zu Aminosäuren bewirkt, kennt man regulatorische Proteasen, die an der Funktionalisierung (Aktivierung, Deaktivierung, Modulierung) von endogenen Peptidwirkstoffen beteiligt sind [KIRSCHKE, H., LANGNER, J., RIEMANN, S., WIEDERANDERS, B., ANSORGE, S. and BOHLEY, P., Lysosomal cysteine proteases. *Excerpta Medica* (Ciba Foundation Symposium 75), 15 (1980); KRÄUSSLICH, H.-G. and WIMMER, E., Viral Proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 701 (1987)]. Insbesondere im Zusammenhang mit der Immunforschung und der Neuropeptidforschung sind eine Reihe solcher sogenannten Konvertasen, Signalpeptidasen oder Enkephalinasen entdeckt worden [GOMEZ, S., GLUSCHANKOF, P., LEPAGE, A., MARRAKCHI, N. and COHEN, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5468 (1988); ANSORGE, S. and SCHÖN, E., *Histochem.* 82, 41 (1987)].

Aufgrund der Häufigkeit des Vorkommens der Aminosäure Prolin in einer Vielzahl von Peptidhormonen und den damit verbundenen Struktureigenschaften dieser Peptide wird für prolinspezifische Peptidasen eine den Signalpeptidasen analoge Funktion diskutiert [YARON, A., The Role of Proline in the Proteolytic Regulation of Biologically Active Peptides. *Biopolymers* 26, 215 (1987); WALTER, R., SIMMONS, W.H. and YOSHIMOTO, T., Proline Specific Endo- and Exopeptidases. *Mol. Cell. Biochem.* 30, 111 (1980); VANHOOF, G., GOOSSENS, F., DE MEESTER, I., HENDRIKS, D. and SCHARPÉ, S., Proline motifs and their biological processing. *FASEB Journal* 9, 736 (1995)]. Dabei bestimmt Prolin in diesen Peptiden durch seine besondere Struktur sowohl Konformation als auch Stabilität dieser Peptide, indem sie vor Abbau durch unspezifische Proteasen schützt [KESSLER, H., Konformation und biologische Wirkung von zyklischen Peptiden. *Angew. Chem.* 94, 509 (1982)]. Enzyme, die dagegen hochspezifisch strukturverändernd auf Prolin-haltige Sequenzen einwirken (HIV-Protease, Cyclophylin u. a.) sind attraktive Ziele der aktuellen Wirkstoff-Forschung. Insbesondere für die nach dem Prolin spaltenden Peptidasen Prolyl Endopeptidase (PEP) und

15

20

25

30

Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV) konnten Beziehungen zwischen der Modulation der biologischen Aktivität von natürlichen Peptidsubstraten und deren selektiver Spaltung durch diese Enzyme wahrscheinlich gemacht werden. So nimmt man an, daß PEP eine Rolle beim Lernen bzw. im Gedächtnisprozeß spielt und DP IV in die Signalübertragung während der Immunantwort einbezogen ist [ISHIURA, S., TSUKAHARA, T., TABIRA, T., SHIMIZU, T., ARAHATA K. and SUGITA, H., FEBS-Letters 260, 131 (1990); HEGEN, M., NIEDOBITEK, G., KLEIN, C.E., STEIN, H. and FLEISCHER, B., J. of Immunology 144, 2908 (1990)].

Ähnlich wie die außerordentliche Prolinspezifität dieser Enzyme wird ihre hohe Selektivität für die Aminosäure Alanin innerhalb typischer Erkennungsregionen in Substraten dieser Enzyme diskutiert, wonach Alanin-haltige Peptide ähnliche Konformationen einnehmen können wie strukturanaloge Prolin-haltige Peptide. Kürzlich wurden derartige Eigenschaften Alanin-haltiger Peptidketten durch Punktmutation (Austausch von Prolin gegen Alanin) nachgewiesen [DODGE, R.W. and SCHERAGA, H.A., Folding and unfolding kinetics of the proline-to-alanine mutants of bovine pancreatic ribonuclease A. *Biochemistry* 35 (5) 1548 (1996)].

DP IV- bzw. DP IV-analoge Aktivität (z. B. besitzt die cytosolische DP II eine der DP IV nahezu identische Substratspezifität) kommt im Blutkreislauf vor, wo sie hochspezifisch Dipeptide vom N-Terminus biologisch aktiver Peptide abspaltet, wenn Prolin oder Alanin die benachbarten Reste der N-terminalen Aminosäure in deren Sequenz darstellen. Deshalb wird davon ausgegangen, daß dieses Enzym an der Regulation von Polypeptiden *in vivo* beteiligt ist [VANHOOF, G., GOOSSENS, F., DE MEESTER, I., HENDRIKS, D. and SCHARPÉ, S., Proline motifs and their biological processing, *FASEB Journal* 9, 736 (1995)].

Die Glukose-abhängigen insulinotropen Polypeptide: Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP<sub>1-42</sub>) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP-1<sub>7-36</sub>), Hormone, die die Glukose-induzierte Insulinsekretion des Pankreas stimulieren (auch *Incretine*), sind Substrate der DP IV, da sie von den N-terminalen Sequenzen dieser Peptide die Dipeptide Tyrosinyl-Alanin bzw. Histidyl-Alanin *in vitro* und *in situ* abspalten kann [MENTLEIN, R., GALLWITZ, B., and SCHMIDT, W.E., Dipeptidyl Peptidase IV hydrolyzes gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur. J. Biochem.* 214, 829 (1993)].

Die Reduktion derartiger DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Spaltung solcher

10

15

20

25

30

Substrate in vivo kann dazu dienen, unerwünschte Enzymaktivität unter Laborbedingungen als auch in pathologischen Zuständen von Säuger-Organismen wirksam zu unterdrücken [DE-MUTH, H.-U., Recent developments in the irreversible inhibition of serine and cysteine proteases. J. Enzyme Inhibition 3, 249-278 (1990); DEMUTH, H.-U. and HEINS, J., On the catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV. in Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26) in Metabolism and the Immune Response (B. Fleischer, Ed.) R.G. Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1-35 (1995)]. Z. B. basiert Diabetes mellitus Typ II (auch Altersdiabetes) auf einer verminderten Insulinsekretion bzw. Störungen in der Rezeptorfunktion, die u. a. in proteolytisch bedingten Konzentrationsanomalien der Incretine begründet sind [BROWN, J.C., DAHL, M., KWAWK, S., MCINTOSH, C.H.S., OTTE, S.C. and PEDERSON, R.A. Peptides 2, 241 (1981); SCHMIDT, W.E., SIEGEL, E.G., GALLWITZ, B. KUMMEL, H., EBERT, R. and CREUTZFELDT, W., Characterization of the inulinotropic activity of fragments derived from gastric inhibitory polypeptide. Diabetologia 29, 591A (1986); ADELHORST, K., HEDEGAARD, B.B., KNUDSEN, L.B. and KIRK, O., Structure-activity studies of glucagon-like peptide. J. Biol. Chem. 296, 6275 (1994)].

Hyperglykämie und damit verbundene Ursachen bzw. Folgeerscheinungen (auch *Diabetes mellitus*) werden nach gegenwärtigem Stand der Technik durch die Verabreichung von Insulin (z.B. von aus Rinderpankreas isoliertem oder auch gentechnisch gewonnenem Material) an erkrankte Organismen in verschiedenen Darreichungsformen behandelt. Alle bisher bekannten, als auch die moderneren Verfahren zeichnen sich durch hohen Materialaufwand, hohe Kosten und oft durch entscheidende Beeinträchtigungen der Lebensqualität der Patienten aus. Die klassische Methode (tägliche *i.v.*. Insulin-Injektion, üblich seit den dreißiger Jahren) behandelt die akuten Krankheitssymptome, führt aber nach längerer Anwendung u. a. zu schweren Gefäßveränderungen (Arteriosklerose) und Nervenschädigungen [LACY, P., Status of Islet Cell Transplantation. *Diabetes Care* 16 (3) 76 (1993)].

Neuerdings wird die Installation subkutaner Depot-Implantate (die Insulinabgabe erfolgt dosiert, und die täglichen Injektionen entfallen) sowie die Implantation (Transplantation) intakter Langerhansscher Zellen in die funktionsgestörte Pankreasdrüse oder andere Organe und Gewebe vorgeschlagen. Derartige Transplantationen sind technisch aufwendig. Weiterhin stellen sie einen risikobehafteten chirurgischen Eingriff in den Empfängerorganismus dar und verlangen auch bei Zellverpflanzungen nach Methoden zur Suppression bzw. der Umgehung

10

30

des Immunsystems [LACY, P., Treating Diabetes with Transplanted Cells. Sci. Americ. 273 (1) 40-46 (1995)].

Die möglichst orale Applikation hochaffiner, niedermolekularer Enzyminhibitoren dagegen ist eine kostengünstigere Alternative z. B. zu invasiven chirurgischen Techniken bei der Behandlung pathologischer Erscheinungen. Derartige Enzyminhibitoren finden inzwischen therapeutischen Einsatz als Immunsuppressiva, Antithrombotika und als AIDS-Virostatika. Durch chemisches Design von Stabilitäts-, Transport- und Clearence-Eigenschaften kann deren Wirkungsweise modifiziert und auf individuelle Eigenschaften abgestimmt werden [SANDLER, M. and SMITH, H.J., Hrsg., Design of Enzyme Inhibitors as Drugs. Oxford University Press, Oxford (1989); MUNROE, J.E., SHEPHERD, T.A., JUNGHEIM, L.N., HORNBACK, W.J., HATCH, S.D., MUESING, M.A., WISKERCHEN, M.A., SU, K.S., CAMPANALE, K.M., BAXTER, A.J., and COLACINO, J.M., Potent, orally bioavailable HIV-1 protease inhibitors containing noncoded D-amino acids. Bioorg. Medicinal Chem. Letters 5 (23) 2897 (1995)].

Das Ziel der Erfindung ist ein einfaches und neuartiges Verfahren zur Senkung des Blutglukosespiegels, das erfindungsgemäß dadurch erreicht werden kann, daß mittels Verabreichung von Effektoren an einen Säugerorganismus, in kausaler Folge die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide GIP<sub>1-42</sub> und GLP-1<sub>7-36</sub> (o.a. GLP-1<sub>7-37</sub> oder deren Analoga) durch DP IV- oder DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieser Pepdidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert wird.

Der Erfindung liegt der überraschende Befund zugrunde, daß eine Reduktion der im Blutkreislauf agierenden DP IV- oder DP IV-ähnlichen enzymatischen Aktivität kausal zur Beeinflussung des Blutzuckerspiegels führt. Es wurde gefunden, daß

- 25 1. die Verminderung von DP IV- bzw. DP IV-analoger Aktivität zu relativer Stabilitätserhöhung der Glukose-stimulierten, oder extern zugeführten Incretine (oder deren Analoga) zur Folge hat, d.h. durch Applikation von Effektoren der DP IV bzw. DP IV-anloger Proteine der Incretin-Abbau im Blut kontrolliert werden kann.
  - 2. erhöhte biologische Abbaustabilität der Incretine (oder ihrer Analoga) eine Wirkungsveränderung endogenen Insulins zur Folge hat.

20

25

30

- die durch Reduktion der DP IV- bzw. DP IV-analogen enzymatischen Aktivität im Blut erzielte Stabilitätserhöhung der Incretine in nachfolgender Veränderung der Glukoseinduzierten Insulinwirkung resultiert und damit zu einer mittels DP IV-Effektoren kontrollierbaren Modulierung des Blut-Glukosespiegels führt.
- Die Erfindung betrifft somit die Verwendung von Effektoren der Dipeptidyl Peptidase VI (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität. Zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykaemie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung von Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität an Säugern der Verhinderung oder Milderung pathologischer
- Stoffwechsel-Anomalien von Säuger-Organismen ausgewählt aus Glukosurie, Hyperlipidaemie, metabolischer Azidosen und Diabetes Mellitus. In einer weiteren bevorzugten Ausfuehrungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter

die für Hyperglykaemie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man einem Säuger-Organismus eine therapeutisch wirksame Menge eines Effektos der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität verabreicht.

In einer zweiten bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Effektoren der DP IV-bzw. der DP IV-Analogen Enzymaktivität zur Anwendung in einem Verfahren zur Senkung des Blutzucker-Spiegels unter die für Hyperglykaemie charakteristische Glukose-Konzentration im Serum eines Säuger-Organismus.

Die erfindungsgemäß applizierten Effektoren der DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzyme können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren der DP IV-Expression, Bindungsproteine oder Antikörper dieser Enzymproteine oder Kombinationen aus diesen verschiedenen Stoffen, die DP IV- bzw. DP IV-analoge Proteinkonzentration im Säugerorganismus reduzieren, zum Einsatz kommen. Erfindungsgemäße Effektoren sind z.B. DP IV-Inhibitoren wie die Dipeptidderivate bzw. Dipeptidmimetika Alanyl-Pyrolidid, Isoleucyl-Thiazolidid sowie das Pseudosubstrat N-Valyl-Prolyl, O-Benzoyl Hydroxylamin. Derartige Verbindungen sind aus der Literatur bekannt [DEMUTH, H.-U., Recent developments in the irreversible inhibition of serine and cysteine proteases. J. Enzyme Inhibition 3, 249 (1990)] oder in Analogie zu den in der Literatur be-

schriebenen Methoden herstellbar.

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine neuartige Herangehensweise zur Senkung erhöhter Blutglukosekonzentration im Serum von Säugern dar. Es ist einfach, kommerziell nutzbar und zur Anwendung bei der Therapie, insbesondere von Erkrankungen, die auf überdurchschnittlichen Blutglukosewerten basieren, in der Humanmedizin geeignet.

Die Effektoren werden in Form von pharmazeutischen Präparaten enthaltend den Wirkstoff in Kombination mit üblichen aus dem Stand der Technik bekannten Trägermaterialien verabreicht. Beispielsweise werden sie parenteral (z.B. i.v., in physiologischer Kochsalzlösung) oder enteral (z.B. oral, formuliert mit üblichen Trägermaterialien wie z. B. Glukose) appliziert.

In Abhängigkeit von ihrer endogenen Stabilität und ihrer Bioverfügbarkeit müssen einfache oder auch mehrfache Gaben der Effektoren erfolgen, um die erwünschte Normalisierung der Blutglukosewerte zu erreichen. Z. B. kann im Falle von Aminoacyl-Thiazolididen ein solcher Dosisbereich zwischen 1.0 mg und 10.0 mg Effektorsubstanz pro Kilogramm liegen.

10

#### Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Inhibierung der DP IV-katalysierten Hydrolyse der Incretine GIP<sub>1-42</sub> und GLP-17-36 in situ

5

Sowohl in vitro mit gereinigtem Enyzm als auch in situ, z.B. in gepooltem humanem Serum, kann man die Hydrolyse der Incretine, verursacht durch DP IV- bzw. DP IV-analoge Aktivität, nachweisen bzw. mit Hilfe von Inhibitoren unterdrücken (Abb. 1).

Erfindungsgemäß erreicht man *in situ* bei Inkubation von 30 μM GIP<sub>1-42</sub> bzw. 30 μM GLP-1<sub>7-36</sub> und 20 μM Isoleucyl-Thiazolidid (1a), einem reversiblen DP IV-Inhibitor in 20 %-igem Serum bei pH 7.6 und 30 °C die komplette Unterdrückung der Enzym-katalysierten Hydrolyse beider Peptid-hormone innerhalb von 24 Stunden (1b und 1c, jeweils obere Spektren. Synthetisches GIP<sub>1-42</sub> (5 μM) und synthetisches GLP-1<sub>7-36</sub> (15 μM) wurden mit humanem Serum (20 %) in 0.1 mM TRICINE Puffer bei pH 7.6 und 30 °C für 24 Stunden inkubiert. Proben der Inkubationsansätze (für GIP<sub>1-42</sub> 2.5 pmol und im Falle von GLP-1<sub>7-36</sub> 7.5 pmol) wurden nach verschiedenen Zeiten entnommen. Die Proben wurden mit 2',6'-Dihydroxyacetophenon als Matrix co-kristallisiert und mittels MALDI-TOF-Massen-spektrometrie analysiert. Die Spektren (Abb. 1) stellen Akkumulationen von 250 einzelnen Laserschüssen pro Probe dar.

- 20 (1b) Die Signale im Bereich von m/z 4980.1 ± 5.3 entsprechen GIP<sub>1-42</sub> (M 4975.6) und m/z 4745.2 ±5.5 dem DP IV-Hydrolyseprodukt GIP<sub>3-42</sub> (M 4740.4).
  - (1c) Die Signale m/z 3325.0 ± 1.2 entsprechen GLP-1<sub>7.36</sub> (M 3297.7) und m/z 3116.7 ± 1.3 dem DP IV-Hydrolyseprodukt GLP-1<sub>9.36</sub> (M 3089.6).

In den Versuchsansätzen ohne Inhibitor wurden die Incretine in dieser Zeit fast vollständig abgebaut (Abb. 1b und 1c, jeweils untere Spektren).

Beispiel 2: Inhibierung des Abbaus von GLP-17-36 durch den DP IV-Inhibitor Isoleucyl-Thiazolidid in vivo.

Verfolgt man den Metabolismus der nativen Incretine (hier GLP-1<sub>7-36</sub>) im Serum der Ratte in Abhängigkeit in Gegenwart des DP IV-Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid (i.v. Injektion einer 1.5 μM Inhibitorlösung in 0.9 %-iger Kochsalzlösung) gegenüber einer Kontrolle, so ist bei einer Konzentration des Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid von ca. 0.1 mg/kg Laborratte bei den Inhibitor-behandelten Versuchstieren (n = 5) im Verlaufe des Versuchszeitraums kein Abbau des insulino-tropen Peptidhormons GLP-1<sub>7-36</sub> zu beobachten (Abb. 2).

Zur Detektion der Metaboliten in Anwesenheit und Abwesenheit des DP IV-Inhibitors (20 Minuten nach vorheriger i.v.-Inhibitor- bzw. Kochsalzgabe) erhielten die Versuchs- und Kontrolltiere i.v. 50 - 100 pM <sup>125</sup>I-GLP-1<sub>7-36</sub> (spezifische Aktivität ca. 1 μMCi/pM). Blutproben wurden nach 2 - 5 min entnommen und das Plasma mittels 20 % Acetonitril extrahiert. Nachfolgend wurde der Peptidextrakt mittels RP-HPLC separiert und die Radioaktivität der Fraktionen an einem γ-Counter analysiert. Die gefundene Aktivität ist in cpm (counts per minute relativ zum Maximum angegeben).

Beispiel 3: Modulation der Insulinwirkung und Senkung des Blutglukosespiegels nach i.v.

Applikation des DP IV-Inhibitors Isoleuzyl-Thiazolidid in vivo.

20

25

5

10

An der durch intraduodenale (i.d.) Injektion Glukose-stimulierten Ratte, kann durch i.v. Gabe verschiedener DP IV-Effektoren, z. B. von 0.1 mg Isoleucyl-Thiazolidid pro kg Ratte eine auf die Inhibitorwirkung zurückgehende, zeitlich verzögert einsetzende Senkung des Glukose-spiegels beobachtet werden. Dieser Effekt ist dosisabhängig und nach Absetzen der Infusion von 0.05 mg/min des DP IV-Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid pro kg Ratte reversibel. Die i.v. Applikation der gleichen Glukosemenge von Inhibitor-behandelten und Kontroll-Tieren zeigt im Gegensatz zur den i.d. Glukose-stimulierten Versuchstieren keine vergleichbare Wirkung. Abbildung 3 verdeutlicht diese Zusammenhänge an den Inhibitor-abhängigen Veränderungen der Plasmaparameter: A - DP IV-Aktivität, B - Plasma-Insulinspiegel, C - Blutglukosespiegel.

iger Dextroselösung (w/v).

15

Die Versuchstiere (n = 5, männliche Wistar-Ratten, 200-225 g) erhielten als Initialdosis 1.5 μM Isoleucyl-Thiazolidid in 0.9 %-iger Kochsalzlösung (Δ) oder gleiche Volumina 0.9%-ige Kochsalzlösung ohne Inhibitor (Ξ) (Kontrollgruppe n = 5). Die Versuchsgruppe erhielt weiterhin eine Infusion des Inhibitors von 0.75 μM/min über 30 min Versuchszeit (\*). Der Kontrollgruppe wurde im gleichen Zeitraum eine Inhibitor-freie 0.9%-ige Kochsalzlösung infundiert. Zum Zeitpunkt t=0 erhielten die Tiere *i.d.* eine Glukosedosis von 1g/kg 40%-

Allen Versuchstieren wurden Blutproben in zehn Minutenabständen entnommen.

Glukose Messungen erfolgten am Vollblut (Lifescan One Touch II analyzer) während die DP IV-Aktivität und die Insulinkonzentrationen im Plasma bestimmt wurden.

Der hier angewandte Insulintest ist empfindlich zwischen 10 und 160 mU/ml [PEDERSON, R.A., BUCHAN, A.M.J., ZAHEDI-ASH, S., CHEN, C.B. & BROWN, J.C. Reg. Peptides. 3, 53-63 (1982)]. Die DP IV-Aktivität wurde spektralphotometrisch bestimmt [DEMUTH, H.-U. and HEINS, J., On the catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV. in Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26) in Metabolism and the Immune Response (B. Fleischer, Ed.) R.G. Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1-35 (1995)]. Alle Meßwerte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

WO 97/40832 PCT/DE97/00820

10

#### Patentansprüche

- Verwendung von Effektoren der Dipeptidyl Peptidase (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus.
- 2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verabreichung von Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität an Säuger der Verhinderung oder Milderung pathologischer Stoffwechsel-Anomalien von Säuger-Organismen ausgewählt aus Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischer Azidosen und Diabetes mellitus dient.
- 3. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Effektoren der Dipeptidyl Peptidase (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren der DP IV-Expression, Bindungsproteine oder Antikörper dieser Enzymproteine oder Kombinationen der genannten Effektoren verwendet werden.
- 4. Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität zur Anwendung in einem Verfahren zur Senkung des Blutzucker-Spiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukose-Konzentration im Serum eines Säuger-Organismus.

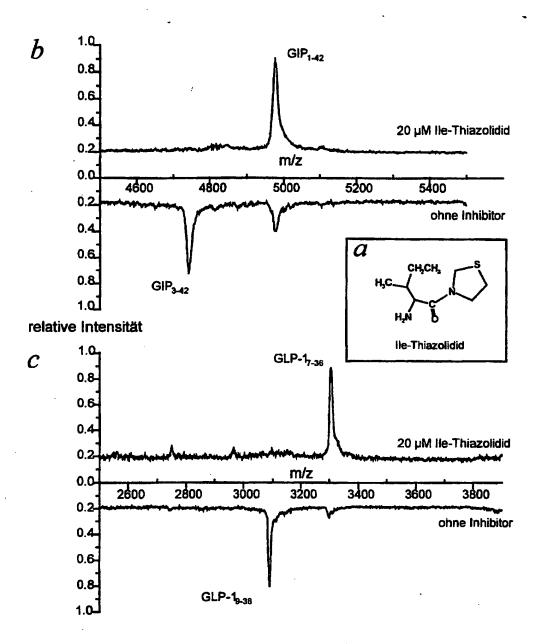


Abb. 1: MALDI-TOF-Analyse der DP IV-katalysierten Hydrolyse von GIP<sub>1-42</sub> (b) und GLP-7-36 und deren Hemmung durch Isoleucyl-Thiazolidid (a).

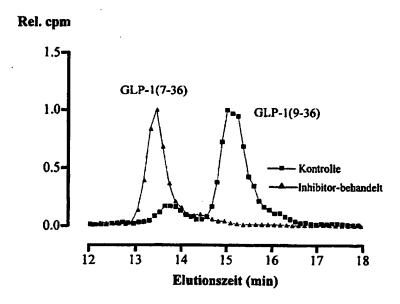
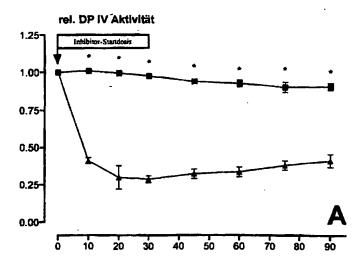
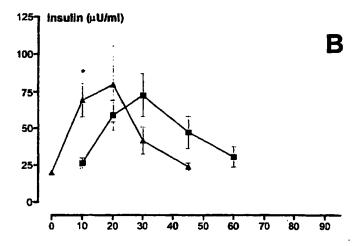


Abb. 2: HPLC-Analyse der Serumpräsenz von GLP-1 Metaboliten in Gegenwart und in Abwesenheit DP IV Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid in vivo.





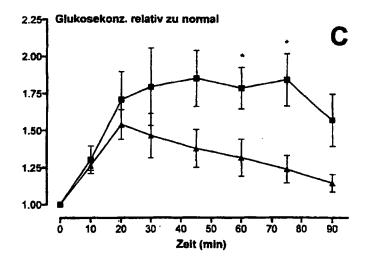


Abb. 3: Einfluß des DP IV-Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid auf verschiedene Blutparameter der i.d.-Glukose-stimulierten Ratte.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. al Application No PCT/DE 97/00820

A. CLASS IPC 6	IFICATION OF SUBJECT MATTER A61K31/425		<u>-</u>
According	to International Patent Classification (IPC) or to both national cla	accilication and IPC	
	S SEARCHED		
IPC 6	documentation searched (classification system followed by classifi A61K	icaton symbols)	·
Documenta	tion searched other than minimum documentation to the extent th	ast such documents are included in the fields	rearched
Electronic d	data base consulted during the international search (name of data	base and, where practical, search terms used	
C. DOCUM	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the	e relevant passages	Relevant to claim No.
A	HU. DEMUTH: "Recent developm inhibiting cysteine and serine J. ENZYME INHIB., vol. 3, no. 4, 1990,		
	pages 249-278, XP002041620 cited in the application		
A	T.J. KIEFFER ET AL.: "degradat glucose-dependent insulinotropi polypeptide and truncated gluca	c gon-like	
	peptide 1 in vitro and in vivo dipeptidyl peptidase IV." ENDOCRINOLOGY, vol. 136, no. 8, 1995,	by	
	pages 3585-3597, XP002041621		•
]		-/	
			,
X Furd	her documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family members are listed	in annex.
1	tegories of cited documents :	T later document published after the inter-	
conside	ent defining the general state of the art which is not keed to be of particular relevance	or priority date and not in conflict w cited to understand the principle or the invention	
filing c		"X" document of particular relevance; the cannot be considered novel or cannot	t be considered to
waren:	ent which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another n or other special reason (as specified)	involve an inventive step when the do "Y" document of particular relevance; the cannot be considered to involve an in	claimed invention
'O' docume other n	ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or means	document is combined with one or m ments, such combination being obvio	ore other such docu-
"P" docume later th	ent published prior to the international filing date but nan the priority date claimed	in the art.  *&* document member of the same patent	family
Date of the	actual completion of the international search	Date of mailing of the international se	arch report
24	4 September 1997	13.10.97	
Name and n	nailing address of the ISA  European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2	Authorized officer	
	NL - 2220 HV Rijswijk Td. (+ 31-70) 340-2040, Tz. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016	Klaver, T	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. al Application No
PCT/DE 97/90820

	PCT/DE 9		7/00820	
(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
ategory *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.	
<b>A</b>	DATABASE WPI Week 9217 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 92-132891 XP002041622 & DD 296 075 A (LUTHER UNIVERSITÄT HALLE) , 21 November 1991 see abstract	-		
•	WO 95 22326 A (ZERIA PHARMACEUTICAL CO.) 24 August 1995			
			·	
	, ·			
	·		·	
,	·			

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. all Application No
PCT/DE 97/00820

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WD 9522326 A	24-08-95	JP 7228529 A AU 681251 B AU 1718195 A EP 0754454 A	29-08-95 21-08-97 04-09-95 22-01-97

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Alex Aktenzeichen
PCT/DE 97/00820

A. KLASS IPK 6	SIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES A61K31/425			
1rn v	NUINJI/ 4LJ			
Nach der I	Internationalen Patentidassifikation (IPK) oder nach der nationalen I	Klassifikation und der IPK		
	ERCHIERTE GEBIETE	Particular visit of the second		
Recherchie	erter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssym A61K	abole )		
1111	AUIR .			
Recherctue	rte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen.	soweit diese unter die recherchierten Gebier	te fallen	
•			• •	
Während de	ler internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (	Name der Datenbank und evtl. verwendete	: Suchbegriffe)	
			•	
C. ALS W	ESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN			
Kategone*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Anga	sbe der in Betracht kommenden Tesle	Betr. Anspruch Nr.	
A	HU. DEMUTH: "Recent development			
A	inhibiting cysteine and serine pr			
	J. ENZYME INHIB.,			
·	Bd. 3, Nr. 4, 1990, Seiten 249-278, XP002041620			
	in der Anmeldung erwähnt			
A	T.J. KIEFFER ET AL.: "degradation	on of		
^	glucose-dependent insulinotropic			
	polypeptide and truncated glucage	on-like		
	peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV."	y		
	ENDOCRINOLOGY.	`.		
	Bd. 136, Nr. 8, 1995, Seiten 3585-3597, XP002041621			
	261feu 3202-223/, VL005041051			
	<u> </u>	-/	İ	
		·		
	tere Veröffendichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu	X Siehe Anhang Patentfamilie		
	ebrnen : Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :	T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem		
"A" Veröffe	entlichung, die den allgemennen Stand der Technik definiert, sicht als besonders bedeutsam anzuschen ist	oder dem Prioritätsdatum veröffentlich Anmeldung nicht kollidiert, sondern ni	st worden ist und mit der er zumVerständnis des der	
"E" illteres	Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Idedatum veröffentlicht worden ist	Erfindung zugrundeliegenden Prinzips Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von beworderer Bedei	•	
'L' Veröffe scheine	entlichung, die geeignet ist, einen Prioritätzenspruch zweifdhaft er- en zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer	"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeu kann allein aufgrund dieser Veröffentli erfinderischer Tätigkeit beruhend betra	ching micht als neu oder auf	
andere soll od	m im Recharchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden - der die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie	Y' Veröffentlichung von besonderer Bedet kann nicht als auf erfinderischer Tätigh	stung die beanspruchte Erfindung	
O" Veroffe	ührt) entlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,	werden, wenn die Veröffentlichung mit Veröffentlichungen dieser Kategorie in	t einer oder mehreren anderen Verbindung gebracht wird und	
"P" Verôffe	knutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht entlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach eanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	diese Verbindung für einen Fachmann "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselbe	naheliegend ist	
	Abschluses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Rec		
24	4.September 1997	1 3. 10. 97		
Name und P	Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde	Bevolkmächtigter Bediensteter		
	Europäisches Patentams, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijawijk Tel. (+ 31.70) 340.2040, Tx. 31 651 erro ni			
	Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni. Klaver, T			

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intem sales Aktenzeichen
PCT/DE 97/00820

	PCT/DE 97/00820				
C.(Fortsetz	(Forestzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN				
Kategorie"	Bezeichnung der Veröffendichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teil	e Betr. Anspruch Nr.			
A	DATABASE WPI Week 9217 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 92-132891 XPG02041622 & DD 296 075 A (LUTHER UNIVERSITÄT HALLE) , 21.November 1991 siehe Zusammenfassung				
A	WO 95 22326 A (ZERIA PHARMACEUTICAL CO.) 24.August 1995				
	•				

### INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inten nales Aktenzeichen
PCT/DE 97/00820

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument			Datum der Veröffentlichung
WO 9522326 A	24-08-95	JP 7228529 A	29-08-95
		AU 681251 B	21-08-97 04-09-95
		AU 1718195 A EP 0754454 A	22-01-97